



UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA

**NUKLEAR POLIHEDROSIS VIRUS (NPV) DALAM *Spodoptera litura*-
KAJIAN MIKROSKOP ELEKTRON, PROTEIN DAN ASID NUKLEIK.**

NAFIZAH BT. MOHD NOH

FSAS 1995 6

**NUKLEAR POLIHEDROSIS VIRUS (NPV) DALAM *Spodoptera litura* -
KAJIAN MIKROSKOP ELEKTRON, PROTEIN DAN ASID NUKLEIK.**

NAFIZAH BT. MOHD NOH

**JABATAN BOKIMIA DAN MIROBIOLOGI
FAKULTI SAINS DAN PENGAJIAN ALAM SEKITAR
UNIVERSITI PERTANIAN MALAYSIA.
SERDANG, SELANGOR**

1994/95



**Nuklear Polihedrosis Virus (NPV) dalam *Spodoptera litura*-
Kajian Mikroskop Elektron, Protein dan Asid Nukleik.**

Oleh

**Nafizah bt. Mohd Noh
(29892)**

**Tesis dikemukakan untuk memenuhi sebahagian dari syarat untuk
ijazah Bachelor Sains (Kepujian)
di Jabatan Biokimia dan Mikrobiologi,
Fakulti Sains dan Pengajian Alam Sekitar,
Universiti Pertanian Malaysia.**

April, 1995

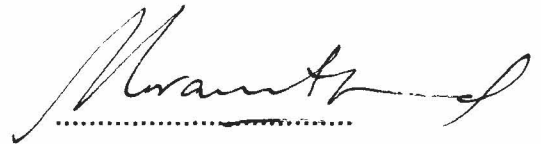


PERAKUAN

Dengan ini, adalah disahkan bahawa laporan projek bertajuk ' Nuklear Polihedrosis Virus Dalam *Spodoptera litura*, Kajian Mikroskop Elektron, Protein dan Asid Nukleik' telah disempurnakan serta dikemukakan kepada Jabatan Biokimia dan Mikrobiologi oleh Nafizah bt. Mohd Noh sebagai memenuhi syarat untuk Ijazah Bachelar Sains (Kepujian) dari Fakulti Sains dan Pengajian Alam Sekitar, Universiti Pertanian Malaysia.

disahkan oleh

Tarikh : 28 - 4 - 95



(Prof. Madya Dr. Norani Abd. Samad)

Penyelia Pertama

Tarikh : 28/4/95

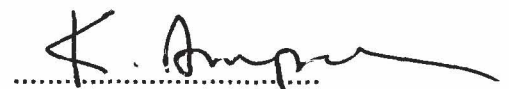


(Prof. Madya Dr. Ahmad Said Sajap)

Penyelia Kedua

disahkan oleh

Tarikh : 28.4.95



(Prof. Madya Dr. Kamarulzaman Ampon)

Ketua Jabatan, Jabatan Biokimia dan Mikrobiologi

Untuk kalian,

Mak,

deritamu dan pengorbananmu hanya

Allah jua yang lebih mengetahui . . .

Abah, Makcik,

Angah, Boy, Alel, Ina,

Azhar, Nur & Linda,

Hanya inilah sahaja yang dapat

ku hadiahkan buat permulaannya . . .

Bersabarlah di atas segala dugaan . . .

- ALONG-

PENGHARGAAN

DENGAN NAMA ALLAH YANG MAHA PEMURAH LAGI MAHA PENYAYANG.

“ Puji-pujian bagi ALLah, yang menciptakan langit dan bumi, menjadikan malaikat-malaikat jadi utusan yang mempunyai sayap dua-dua, tiga-tiga dan empat-empat. Allah menambah kejadian apa yang dikehendakiNya. Sesungguhnya Allah Maha berkuasa atas tiap-tiap sesuatu.”

(Al-Fathir:1)

Setinggi kesyukuraan ke hadrat Ilahi diatas limpah kurnia dan nikmat yang diberikan ini maka dapat jua disempurnakan projek tahun akhir saya.

Ucapan setinggi-tinggi Terima Kasih kepada penyelia projek, Prof. Madya Dr. Norani Abd. Samad yang mana dengan bimbingan dan nasihatnya banyak membantu saya dalam kajian ini.

Tidak dilupakan kepada Prof. Madya Dr. Ahmad Said Sajap dari Fakulti Perhutanan selaku penyelia kedua projek, terima kasih di atas kritikan dan bantuan yang diberikan.

Kepada kakitangan MARDI, Serdang khasnya Pn. Jameah Ismail dan En.Foo yang banyak memberi sumbangan teknikal di dalam menyempurnakan projek saya, terima kasih. Penghargaan juga kepada En. Ho dari Unit Elektron Mikroskop yang sudi menolong saya dari awal hingga ke akhir projek ini.

Sekalung budi juga buat teman-teman dari Makmal Virologi, 143; Kak Najah, Kak Sudani, Kak Zuraidah, Kak Mazidah, Omar, Muhajir, Suzi, Chui Foong dan Mages yang sama-sama memberi sokongan selama projek ini dijalankan.

Akhirnya buat sahabat-sahabat dan sahabiah-sahabiah GPU sekalian, teruskan mata rantai yang telah diamanahkan ini. Khusus kepada housemates 7325 (Baitul Aisyah); Nita, Kak Sue, Kak Min, Kak Gee, Yati, Tini, Zura dan Na. Tanpa bimbingan kalian apakah dapat ku ertikan hakikat kehidupan yang sebenarnya.

Hanya Allah jualah yang dapat membalasnya.

ZULKAEDAH 1415

ISI KANDUNGAN

MUKASURAT

PENGHARGAAN	ii
ISI KANDUNGAN	iii
SENARAI JADUAL	v
SENARAI RAJAH	vi
SENARAI SINGKATAN	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 PENULISAN SEMULA	3
2.1 Latar belakang sejarah	3
2.2 Baculovirus	4
2.3 Morfologi	6
2.3.1 Struktur virion	7
2.3.2 Struktur polihedra dan granul	9
2.4 Infeksi dan replikasi virus	10
2.5 Asid nukleik	11
2.6 Infeksi dan replikasi virus	12
2.7 <i>Spodoptera litura</i> (sn <i>Prodenia litura</i>)	13
2.8 Ujian patogenesisiti	16
BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH	17
3.1 Pemeliharaan larva <i>S.litura</i>	19
3.2 Penulenan virus	19
3.3 Penulenan nukleokapsid	20
3.3.1 Penyediaan grid	22

3.4	Penyediaan sampel untuk TEM	22
3.4.1	Polihedra NPV dan tisu lemak <i>S. litura</i>	22
3.5	Gel poliakrilamida (SDS-PAGE)	26
3.5.1	Penyediaan 11% gel pemisah	26
3.5.2	Penyediaan 4% gel penyusun	26
3.5.3	Penyediaan penanda dan sampel	27
3.5.4	Menjalankan elektroforesis SDS-PAGE dan pewarnaan gel	27
3.6	Pengekstrakan DNA dan pemendakan etanol	28
3.7	Elektroforesis gel agarosa	31
BAB 4	KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN	32
4.1	Pemeliharaan larva <i>S. litura</i> yang terinfeksi	32
4.2	Penulenan virus	34
4.3	Pemerhatian badan inklusi polihedra	36
4.4	Penghasilan nukleokapsid	38
4.5	Pemerhatian melalui TEM	40
4.5.1	NPV tulen	42
4.5.2	Turutan infeksi NPV dalam larva <i>S. litura</i>	42
4.6	Protein melalui SDS-PAGE	57
4.7	Pengekstrakan DNA dan analisis gel agarosa	59
BAB 5	KESIMPULAN	62
RUJUKAN		
APENDIKS		

SENARAI JADUAL

Jadual		Mukasurat
Jadual 3.1	: Bahan-bahan kimia dan biokimia	18
Jadual 3.2	: Penulenan virus NPV	21
Jadual 3.3	: Kaedah pembenaman nipis-ultra	24

SENARAI RAJAH

Rajah		Mukasurat
Rajah 1	Struktur Polihedra NPV dan granulum GV	5
Rajah 2	Kitaran infeksi NPV	14
Rajah 4.1	Larva <i>S. litura</i> sihat	33
Rajah 4.2	Larva <i>S. litura</i> terinfeksi	33
Rajah 4.3	Lapisan virus pada lapisan antara fasa	35
Rajah 4.4a	Badan inklusi polihedra	37
Rajah 4.4b	Kristalin matriks PIB	37
Rajah 4.5a	Nukleokapsid	41
Rajah 4.5b	Nukleokapsid	41
Rajah 4.6	Polihedra NPV dengan virion bersalut tunggal (SNPV)	43
Rajah 4.7	Virion keluar dari polihedra secara evaginasi	44
Rajah 4.8	Infeksi NPV selepas 3 hari dalam tisu lemak	46
Rajah 4.9	Infeksi NPV selepas 3 hari	47
Rajah 4.10	Infeksi NPV selepas 3 hari	48
Rajah 4.11	Infeksi NPV selepas 4 hari	50
Rajah 4.12	Infeksi NPV selepas 4 hari	51
Rajah 4.13	Infeksi NPV selepas 6 hari	53
Rajah 4.14	Infeksi NPV selepas 6 hari	54
Rajah 4.15	Virion NPV selepas menguasai tisu sel	55
Rajah 4.16	Nukleokapsid bersalut tunggal	56
Rajah 4.17	Profil protein NPV (SDS-PAGE)	58
Rajah 4.18	Profil DNA NPV (Elektroforesis gel agarosa)	60
Rajah 4.19	Penentuan berat molekul fragmen DNA	61

Senarai singkatan yang digunakan dalam penulisan kajian.

BDMA	Benzildimetilamina
b/b	Berat/berat
b/i	Berat/isipadu
DDSA	Dodesilenil suksinik anhidrat
Da	Dalton
DNA	Asid Deoksiribonukleik
EDTA	Etelenediaminetetra asitik asid
GV	Virus granulosus
i/b	isipadu/berat
MARDI	Institut Penyelidikan Dan Kemajuan Pertanian Malaysia
kb	kilobes
M	Molar
ml	mililiter
mm	milimeter
MNA	Metil Nadic Anhidrat
nm	nanometer
NPV	Virus Nuklear Polihedrosis
pH	eksponen ion hidrogen
PTA	Asid Fosfotungstik
PIB	Polihedra Badan Inklusi
SDS-PAGE	Natrium dodesil sulfat-gel poliakrilamida
rpm	revolusi per minit
SDS	Natrium dodesil sulfat
sn	Nama saintifik
TA	Tris-asetat
TE	Tris-EDTA
TEM	Mikroskop Elektron Transmisi
TEMED	N,N,N,N - tetrametil etilindiamina
Tris	Tris (hidroksimetil) amino metana
UA	Uranil asetat
v	Volt
WHO	Organisasi Kesihatan Sedunia
°C	Darjah Celsius
μl	mikroliter
μm	mikrometer

ABSTRAK

Baculovirus adalah kumpulan virus yang menyebabkan penyakit kronik pada larva Lepidoptera. Kajian terhadap spesies tempatan, larva *Spodoptera litura* iaitu perosak utama tanaman di Malaysia menunjukkan bahawa virus Nuklear Polihedrosis (NPV) adalah spesifik pada *Spodoptera litura*. Nukleokapsid yang dihasilkan oleh NPV berdiameter 6.45 hingga 133.28 nm dan mempunyai panjang antara 44.5 nm hingga 980.56 nm, berbentuk basili tunggal dan dirangkumi selaput tunggal protein matriks yang dikenali sebagai polihedrin. Polihedra atau badan inklusinya mempunyai pelbagai bentuk dan saiz. Aktiviti protease adalah diperlukan untuk pemecahan polihedrin dari membran dalam keadaan beralkali iaitu antara pH 9.5 hingga 11.5. Infeksi NPV ke atas larva perumah bermula selepas 24 jam terinfeksi dan selepas 72 jam p.i polihedron yang mengandungi virion lengkap terbentuk. Nukleokapsid masuk ke tisu sel secara invaginasi dan akan mendominasi sel perumah. Kematian bermula pada hari keenam. Protein kapsid mempunyai berat molekul 32400 D dan satu fragmen DNA dengan berat molekulnya 9.12 kb dikesan.

ABSTRACT

Baculovirus is a group of viruses that caused a chronic but fatal disease in Lepidopteran larvae. Studies on local species, Spodoptera litura which destroyed major crops in Malaysia revealed that Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV) is specific to Spodoptera litura. Nucleocapsids produced by these virus are large which 6.45 nm to 133 nm in diameter and 44.5 nm to 980.56 nm in length, baciliform in shape, enveloped as a single NPV (SNPV) by a paracrystalline matrix protein known as polyhedrin. The occlusion bodies varies in size and shapes. The protease activity was required for a complete dissociation of polyhedrin from the viral membrane under alkali condition with pH 9.5 to 11.5. NPV infection of larvae began at 24 hour post inoculation (p.i) and that after 72 hour p.i a complete polyhedron with virions formed. Nucleocapsid entered and dominated tissue cells through invagination caused mortality within 6 days. The capsid protein had a molecular weight of 32400 D. Only one fragment DNA with molecular weight 9.12 kb was detected.

BAB 1

PENGENALAN

Sehingga kini, terdapat hampir 10 kumpulan virus yang dikenalpasti menjangkiti serangga (Tinsley dan Kelly, 1988). Baculovirus telah direkodkan sebagai salah satu kumpulan virus serangga yang besar iaitu lebih dari 300 spesies serangga, dari Order Lepidoptera, Diptera, Himenoptera dan Coleoptera dijangkiti (Tinsley dan Kelly, 1985). Baculovirus adalah kumpulan partikel virus yang mempunyai struktur yang kompleks. Partikel Baculovirus kebanyakannya dibungkus dalam protein kristalin yang dikenali sebagai polihedra, kapsul, granul juga dikenali sebagai badan inklusi polihedra (PIB).

Baculovirus terbahagi kepada 3 jenis sub kumpulan utama yang berbeza dari segi morfologinya. Nuklear polihedrosis virus (NPV) mempamerkan bentuk polihedra dan ada 2 struktur yang jelas berkaitan dengan nukleokapsid yang bersalut; NPV yang mempunyai nukleokapsid bersalut tunggal (SNPV) dan NPV yang mempunyai lebih dari satu nukleokapsid dalam satu salut (MNPV). Kumpulan Granulosis virus pula mengandungi hanya satu sahaja nukleokapsid dalam satu salut. Kumpulan ketiga tidak dilingkungi oleh salut. Kebanyakan virus serangga termasuk dalam kumpulan NPV.

Polihedron NPV mempunyai banyak partikel-partikel virus terangkum dalam satu matriks protein . Amnya polihedra ini bertindak sebagai vektor bagi partikel virus untuk menjangkiti satu serangga ke serangga yang lain dan juga dari satu organ ke organ yang lain. Beberapa spesis NPV yang menjangkiti serangga, *Heliothis zea*, *Autographa californica* dan *Spodoptera littoralis* telah diuji keberkesanannya untuk manipulasi kawalan biologi melalui beberapa ujian yang dikendalikan oleh Agensi Perlindungan Persekitaran (EPA), Amerika Syarikat dan Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO) (Burgess *et al.*, 1980). Antara kelebihan NPV sebagai kawalan biologi ialah ianya tidak menjangkiti serangga yang tidak membahaya dan tidak bereplikasi pada mikroorganisma lain, invertebrata melainkan Artropoda. Entomopatogen ini adalah spesifik pada perumah tertentu sahaja (Order Lepidoptera) maka hidupan lain, yang lebih berkepentingan dapat diselamatkan. Penghasilan virus dari serangga adalah sesuai untuk kajian kawalan biologi secara mikrobial. Serangga ini boleh dihidupkan dalam jumlah yang banyak dan murah boleh didapati. Contohnya, *Galleria mellonella* boleh dikultur dalam medium tiruan atau diberi makanan diet tiruan (Smith, 1967).

Objektif kajian termasuklah:

1. Untuk mengkaji ultrastruktur polihedra NPV tulen dan dari larva *Spodoptera litura* yang diinfeksi.
2. Penentuan protein polihedra NPV.
3. Menganalisis genom DNA *Spodoptera litura* NPV.

BAB 2

PENULISAN SEMULA

2.1 Latar belakang sejarah

Penyakit virus serangga mula tercatat seawal 1527 dari sebuah sajak oleh Vida yang menceritakan penyakit 'jaundice' yang menyerang ulat sutera, *Bombyx mori* (Smith, 1967). Coralia dan Maestri (1856) yang mula mengkaji NPV telah dapat membuktikan kewujudan polihedra berbentuk kristal dalam penyakit 'jaundice' dan mengaitkannya dengan 'malady'. Hanya, Bergold (1947) melalui pengemparan secara analitikal dan mikroskop elektron telah dapat menunjukkan ultrastruktur partikel virus tersebut.

Penggunaan virus sebagai vektor pembawa penyakit telah direkodkan oleh Wahl, B. (1905), dimana ia dapat menunjukkan perhubungan antara infeksi yang dikaitkan dengan penyakit 'polyerdekrankheit' pada larva Nun, *Lymantria monacha* yang boleh menembusi ultraturasan (Enstwistle dan Evans, 1985). Balsh (1946) telah berjaya menggunakan virus yang dipencil dari 'sawfly' spruce Eropah, *Gilpinia hercyniae* dari Kanada yang boleh mengawal larva serangga di Newfoundland.

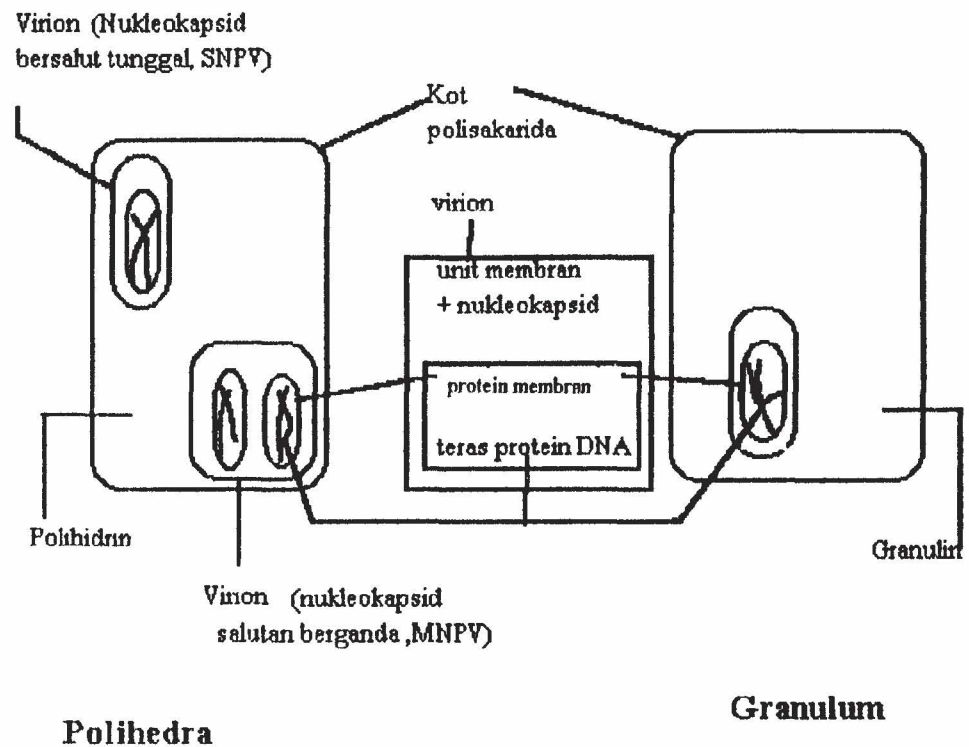
2.2 Baculovirus

Baculo berasal dari perkataan *baculum* yang bermaksud batang, dari bentuk morfologi virion. Baculovirus dari famili Baculoviridae adalah patogenik kepada serangga. Sebanyak 1270 interaksi antara perumah serangga dan virus serangga telah dikenalpasti; 71% dijumpai dalam Lepidoptera, 14% dalam Diptera, 7% dalam Hymenoptera, 5% dalam Coleoptera dan 3% dalam Orthoptera, Isoptera, Hemiptera dan Neuroptera (Entwistle dan Evans, 1985). Baculovirus telah digunakan untuk mengawal serangga di Kanada, Sweden, Perancis, Jerman, Rusia, Romania, Bulgaria, Israel, Mesir, Czechoslovakia dan Amerika Syarikat (Heimpell, 1977).

Berdasarkan strukturnya, empat sub-kumpulan telah dicadangkan klasifikasinya oleh Jawatankuasa Taksonomi Virus Antarabangsa (1990). (Rajah 1). Kumpulan A; NPV terdiri nukleokapsid bersalut tunggal (SNPV) atau lebih dari satu nukleokapsid tersusun secara berganda (MNPV) dalam satu salut. Dalam MNPV lebih seratus nukleokapsid berdiameter ukuran antara 1 hingga 15 μ m terdapat dalam satu polihedra (Vlak dan Rohrmann, 1985). Matriks proteinnya dipanggil polihedrin. Badan inklusi terdiri dari pelbagai bentuk dan saiz contohnya, *Bombyx mori* NPV berbentuk dodekahedron dan *Lymantria monacha* NPV berbentuk tetrahedron (Smith, 1976).

A: Virus Nuklear Polihedrosis

B: Virus Granulosis



Rajah 1 : Struktur polihedra NPV dan granulum GV
(Vlak dan Rohrmann, 1985)

Virus granulosi dari kumpulan B mempunyai satu atau dua nukleokapsid sahaja dalam satu lapis salut. Protein matriknya dikenali sebagai granulin. Ia mempunyai bentuk ovisilindrikal berdimensi antara 250 hingga 300 nm dan 400 hingga 500 nm panjang (Summers, 1977). Kumpulan C pula tiada mempunyai protein matriks yang menyelaputinya dan hanya mempunyai satu nukleokapsid yang berselaput seperti di *Oryctes rhinoceros* NPV. Baculovirus dalam kumpulan D pula dikaitkan dengan kehadiran cecair kaliks dan tidak bersalut. Genomnya dibungkus secara selinder samada tunggal atau berganda.

NPV mempunyai saiz mencapai 15 μm dan dipercayai spesifik pada spesies serangga tertentu (Summers, 1975). Polihedra *S. litura* NPV adalah bujur di bawah mikroskop cahaya (Kotulai, 1994). Ketika ini pengelasan virus adalah mengikut nama perumah yang didudukinya contohnya, *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) atau *Orgyia pseudotsugata* SNPV (OpSNPV). Bagaimanapun pada masa ini terdapat Baculovirus yang boleh menginfeksi lebih dari satu spesis perumah, maka perlu diadakan pengelasan lain.

2.3 Morfologi

Keunikan pada virus ini adalah partikel virusnya yang terangkum dalam kristalin protein atau badan inklusi polihedra (PIB). Virion terdiri dari satu atau

lebih nukleokapsid yang padat elektron berbentuk rod dan bersalut. Nukleokapsidnya mempunyai purata diameter antara 30 nm hingga 60 nm dan panjangnya antara 250 nm hingga 300 nm; dalam sub-famili *Eubaculovirinae*. Bagi virion yang dari sub-famili *Nudibaculovirinae* pula mengandungi satu atau dua jenis. *Oryctes rhinoceros* mempunyai projeksi yang berbentuk panjang dan ekor yang tajam (10 x 270 nm) terlekat pada hujung nukleokapsid yang bersaiz 100 x 200 nm. Sementara virus yang menjangkiti *Heliothis zea* yang tidak mempunyai matriks protein mempunyai morfologinya yang sama seperti baculovirus yang ada matriks protein tetapi mempunyai panjang dua kali ganda, berukuran 80 nm x 414 nm (Wilson, 1991).

2.3.1 Struktur virion

Nukleokapsid dikenalpasti berbentuk rod berdiameter 40 nm dan panjang 350 nm (Kelly, 1985). Bahagian luarnya adalah kapsid. Kapsid dipercayai menolong mengekalkan bentuk rod dan silinder nukleokapsid. Kapsid menghasilkan beberapa bentuk struktur. Beaton dan Filshie (1976) mendapati 4.5 nm subunit tersusun dalam bentuk cakera dan ianya sama bagi NPV dan GV. Harrap (1972) pula mendapati kewujudan substruktur yang belum dapat dikenalpasti lagi cirinya. Burley *et al.* (1982) mengesahkan pemerhatian tersebut yang memperlihatkan kewujudan bentuk kapsid terdiri dari monomer sistem heliks-12 yang tersusun dalam bentuk cincin 3 lapisan berulang pada jarak 13.2 nm.

Pelbagai struktur telah diperhatikan pada hujung nukleokapsid yang dikesan melalui pelbagai pewarnaan. *Tipula paludosa* NPV mempunyai ekor yang berdiameter 10 nm dan panjang 300 nm. Ekor tersebut berlipat atau melingkari antara nukleokapsid dan salut (Kelly, 1985). Ada juga struktur yang seperti kuku diperhatikan samada satu atau kedua-dua hujung (Teakle, 1969). Polariti dalam nukleokapsid ini menolong dalam pembuangan kot pada genom virus iaitu dalam replikasi virus dalam sel perumah (Blissard dan Rohrmann, 1990). Kebanyakan nukleokapsid terdiri dari 2 jenis protein utama iaitu protein teras dan protein salut, yang menghasilkan 3 hingga 4 polipeptida minor (Summers dan Smith, 1978).

Partikel virus terdiri dari nukleokapsid yang bersalut berbentuk rod dan kebanyakannya telah dipencilkan mengandungi satu nukleokapsid yang bersalut. Perbezaan antara SNPV dan MNPV masih lagi dipertikaikan. Salut nukleokapsid mungkin diperolehi samada secara *de novo* dalam nukleus atau melalui penunasan dalam membran plasma (Blissard dan Rohrmann, 1990). Kebanyakan virus yang memperolehi salut pada membran plasma adalah sama ada tunggal atau dubel manakala nukleokapsid pada MNPV terbentuk dalam nukleus (Kelly, 1982). Terdapat perbezaan diantara salutan virus yang terbentuk di nukleus dan membran plasma dari segi serologi. Virus yang berasal dari nukleus wujud dalam polihedra dan berfungsi untuk menjangkiti serangga lain, manakala virus yang mempunyai salut dari membran akan menjangkiti tisu-tisu sel perumah (Blissard dan Rohramnn, 1990). Virus dalam polihedra mempunyai bentuk tertentu yang

membolehkannya bergabung dengan membran plasma perut pada pH yang berkali tinggi. Virus yang berasal dari membran plasma pula menjangkiti sel perumah pada pH neutral atau hampir asidik. Salut dipercayai mengandungi lipid kerana kebolehannya untuk larut dalam eter dan serbuk pencuci semasa penyediaan nukleokapsid (Kelly, 1985).

2.3.2 Struktur polihedra dan granul.

Protein kristalin merupakan perkara yang paling menarik dalam pencirian Baculovirus. Baculovirus adalah satu-satunya kumpulan yang menghasilkan protein kristalin intranuklear walaupun diketahui sitoplasmik polihedrosis dan virus pox dilingkungi dalam sitoplasmik kristalin protein. (Kelly, 1985). Berbanding dengan GV, polihedra adalah matriks kristalin yang besar bersaiz antara 1 hingga 4 μm (Kelly, 1985). Satu-satu polihedra boleh mengandungi lebih seratus partikel. Bagi GV, granulnya berbentuk ovisilindrikal, panjangnya antara 0.3 hingga 0.5 μm dan lebar antara 0.1 hingga 0.4 μm , dan mengandungi hanya satu partikel virus (Kelly, 1985). Bagaimanapun kini telah ada bukti yang menunjukkan bahawa GV boleh mengandungi 2 hingga 5 partikel virus (Crook *et al.*, 1982). Bahagian yang paling menarik pada polihedron adalah kekisi kristalinnya yang bersilang-silang. Polihedron juga dipercayai mempunyai agregasi oktomer polipeptida sebagai subunitnya (Kelly, 1985). Kriteria utama polihedra adalah ianya stabil pada pH

sederhana dan tahan pH beralkali tinggi. Polihedra boleh terlarut dari pH 9.5 ke atas (Kelly, 1985).

Pemecahan *in vitro* akan melarutkan polihedra dan membebaskan partikel virus. Aktiviti protease boleh memudahkan pemecahan. Protein polihedron mempunyai titik isoelektrik 5.8 dan akan dikristalisasikan pada pH yang rendah (Kelly, 1985). Polihedra yang matang dikelilingi oleh satu lapisan luar yang jelas; dirujuk sebagai salutan polihedron. Fungsinya mungkin sebagai pelindung pada radiasi ultra violet dan juga untuk interaksi dengan lapisan permukaan luar. Ketebalan salutan antara 6 hingga 10 nm dan terdiri dari karbohidrat (Minion *et al.*, 1979).

2.4 Struktur protein

Pencirian melalui struktur protein mempunyai potensi untuk pengkelasan virus meskipun hanya melibatkan beberapa spesis Baculovirus tertentu sahaja. Protein kapsid virion adalah kompleks dan mengandungi antara 12 hingga 30 jalur polipeptida, bergantung pada spesis tertentu. Profil polipeptida polihedrin untuk setiap Baculovirus adalah spesifik antara MNPV dan SNPV. Summers dan Smith (1978) mendapati bahawa kapsid AcMNPV mengandungi 2 polipeptida utama, VP 18.5 dan VP 37. Kapsid *Rachiplusia ou* MNPV terdiri dari 5 polipeptida utama.

Sementara kapsid protein *Heliothis zea* SNPV terdiri dari 3 polipeptida utama iaitu VP 16, VP 28 dan VP 63; VP 16, VP 17 dan VP 31 adalah untuk GV.

Jalur-jalur protein polihedra dikesan melalui SDS-PAGE selepas pemecahan di bawah keadaan alkali dengan kehadiran alkalin protease. Granulin biasanya difosforilasi dan memainkan peranan penting sebagai protein kromosomal untuk mengaktifkan transkripsi oleh pelbagai gen pada peringkat sel (Kurstak, 1978). Protein matriks badan inklusi terdiri dari satu aggregasi polipeptida utama dengan berat molekul antara 27,000 D hingga 34,000 D; bergantung pada spesis (Kelly, 1985). Tiada perbezaan yang nyata antara protein matriks NPV dan GV. Bagaimanapun dengan penentuan saiz dan profil protein melalui SDS-PAGE dan pemetaan peptida dapat membezakan antara pemencilan virus yang berlainan (Enswistle dan Evans, 1985).

2.5 Asid nukleik

Genom Baculovirus wujud dalam 3 bentuk iaitu linear (dlDNA), bulat relaks (rcDNA) dan 'covalently closed' (ccDNA) (Summers, 1977). Berat molekulnya antara 90 hingga 230 kb dan ia merangkumi 8 hingga 15% berat zarah virus. Manakala panjang DNA Baculovirus lebih kurang 40 μ m (Kelly, 1985). Kandungan guanin dan sitosinnya antara 28 hingga 59% (Wilson, 1991). Berat

molekul DNA dari 4 spesis yang menjangkiti Spodoptera lain iaitu *S. frugiperda*, *S. exempta*, *S. exigua* dan *S. littoralis* lebih kurang 67.8×10^6 , 82.5×10^6 , 65.4×10^6 dan 62.4×10^6 D masing-masing (Kelly, 1977).

Di antara teknik-teknik yang telah digunakan untuk mengkaji DNA termasuklah kajian mikroskop elektron, sedimentasi , perkaitan kinetik (kinetic reassociation), analisis dengan enzim pembatas dan hibridisasi (Smith dan Summers, 1978). DNA NPV yang dipencil dari empat spesis *Spodoptera* menunjukkan jujukan nukleotida homolog iaitu antara 15% dan 17%.

2.6 Infeksi dan replikasi virus

Baculovirus memulakan replikasinya pada bahagian perut tengah (endodermal) larva setelah ditelan oleh serangga. Matriks protein polihedra akan pecah apabila melalui perut larva yang mempunyai persekitaran alkalin (pH 9.5 hingga 11.5) dan memisahkan selaput nukleokapsidnya. Alkalin protease yang terkandung dalam perut tengah larva membantu meninggikan kadar pemecahan nukleokapsid (Vlak dan Rohrmann, 1985). Virion terbebas akan memasuki perumah melalui percantuman selaput virion dengan mikrovilus pada sel epitelia di perut tengah. Nukleokapsid akan dibawa ke nukleus dan kot protein akan tanggal seawal-awalnya satu jam selepas infeksi. Virus akan melalui pusingan replikasi